スフィンゴ脂質ラフトの構造と機能

山路顕子*

生体膜は蛋白質、脂質、糖質から構成されているが、これらの成分の分布は均一ではない。このことは、細胞機能を営む上で重要な役割を果たしている。ラフトは細胞膜上にある微小膜領域であり、小胞輸送や細胞内情報伝達などに寄与していると考えられている。本稿では、ラフトについてのこれまでの知見、および解析における問題点や今後の課題などを述べる。さらに、現在筆者らの研究室で行なっている、ラフト形成に必須の脂質成分スフィンゴミエリンの動態や機能についての解析を紹介する。

生体膜の構造と機能

生体は細胞をその基本単位として構成されている。そしてすべての細胞は、生体膜と呼ばれる膜構造により形作られている。すなわち生体膜の第一の役割は、まったく異なる環境である細胞内外、あるいはオルガネラ内外を隔てるバリアーとしての機能である。さらに生体膜は、外界との相互作用において、また自らの命を維持するための反応の場として重要な役割を担っている。たとえば、細胞やオルガネラが必要な物質を取り込んだり、不要なものを排出するには、必ず膜を介さなければなら

ない。膜には選択透過性があるため、細胞は巧妙に物質の授受を行なうことができる。また、生体を維持するためには、個々の細胞は近隣の細胞と密に連絡を取り合わなければならない。このとき膜は周囲の環境を感知するセンサーとして機能している。さらに生体膜は、生命の維持に必要なエネルギーを産生するための酵素反応の場としても機能している。

では、これらの生体膜の機能はどのようにして生み出され、制御されているのだろうか？ この疑問に答える手掛かりは膜の構造にある。生体膜は蛋白質、脂質、糖質からなっている。1972年にSingerとNicolsonが提唱した流動モザイクモデルによると、両親媒性である脂質分子が疎水性領域を互いに向けあって流動的な脂質二重層膜を形成し、そこに種々の機能を担った蛋白質が介在している(図1)。ここでは脂質二重層膜は、単に蛋白質に反応の場を提供しているにすぎない。流動モザイクモデルの基本概念は現在も受け入れられているが、その後の研究で、膜蛋白質のみならず膜脂質もまた不均一に存在していることがわかってきた。臓器・細胞種によって脂質成分が異なるのは当然のことながら、1個の細胞でもオルガネラによって脂質組成が異なっているのである。このことは、各オルガネラが固有の機能をもつ上で

Structure and Function of Sphingolipid Membrane Raft

*Akiko YAMAJI-HASEGAWA, 理化学研究所

図 1 ■流動モザイクモデル

両親媒性である脂質が流動的な二重膜を形成し、その中に蛋白質が浮かんでいる。

重要な役割を果たしていると考えられている。また脂質二重層膜の外層と内層でも脂質組成は著しく異なっており、外層には主にコリンリン脂質が、内層には主にアミノリン脂質が局在している。さらに近年、同一膜面上でもその脂質分布は異なっているという概念が広まり、最も注目を浴びているトピックの一つとなっている。すなわち、膜面上で各成分はランダムに分布するのではなく、いくつかの成分が集まってマイクロドメインを形成することにより、効率よくその機能を発現していると考えられている。

以上のような生体膜の特異な構造は、どのようにして作り上げられるのだろうか。また細胞機能にどう関わっているのだろうか。これらの機構を分子レベルで解明するための研究が世界中で行なわれている。本稿では、マイクロドメインのうち現在最も注目され、最も解析が進んでいる「ラフト」に焦点を当て、これまでの知見と問題点を紹介する。さらに筆者らの研究室では、ラフトの形成に最も重要な役割を担っている脂質スフィンゴミエリンの細胞内動態と機能の解明を目指した研究を行なっているので、そのストラテジーや今後の展開などについても述べたい。

細胞膜上の特異的領域ラフトの構造と機能

細胞の形質膜にはコレステロール、スフィンゴミエリン、糖脂質を主成分とする膜ドメイン（ラフト）が存在し、細胞内小胞輸送や情報伝達などに関与している、というのがラフトの概念の骨子である。ラフトの概念が初めて提唱されてから10年以上が経過する。その間多く

の研究者が生化学的解析や免疫学的解析を行ない、ラフトに含まれる分子が明らかになってきた。しかし、技術的な問題から生細胞でラフトを観察するのは容易ではなく、その実体の解明は遅れていた。ここ数年、物理化学的な手法が取り入れられ、ラフトの実体が徐々に解明されつつある。

1. ラフトの概念

上皮細胞や神経細胞のような極性をもつ細胞の形質膜は、機能も組成も異なるいくつかの領域に分かれている。上皮細胞の場合、タイトジャンクションと呼ばれる接着構造によって、アピカル領域と基底領域に仕切られている(図2)。アピカル領域はスフィンゴ脂質(スフィンゴ糖脂質とスフィンゴミエリン)含量がきわめて高くなっており、さらにグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカー型蛋白質などの特定の蛋白質も、この領域に存在している。各領域の成分は、タイトジャンクションを越えて反対側の領域に移ることはできない。したがって、このような分布を形成するためには、膜成分の細胞内輸送経路に何らかの制御が必要である。新たに合成された蛋白質や脂質はゴルジ体で糖鎖付加などの修飾を受けた後、トランスゴルジ領域(TGN)から細胞内の各領域へ輸送される。このことからSimonsらは、上皮細胞の場合、TGNでスフィンゴ脂質含量の高い特異的な小胞が形成され、そこにGPIアンカー型蛋白質なども取り込まれ、その小胞が何らかの機構によってアピカル領域に選択的に輸送されるのではないかという仮説を提唱した¹⁾。すでに、リン脂質の人工膜中でスフィンゴ脂質がクラスターを形成することが報告されており、

図 2 ■ 上皮細胞の極性

形質膜がタイトジャンクションによって、アピカル領域と基底領域に仕切られており、各々の成分はトランスゴルジ領域から選別輸送される。また極性を保つためには、エンドサイトーシス、エクソサイトーシスも各領域に固有の経路が必要であると考えられる。

生体膜中でも同様の構造が存在することが示唆されていた⁽²⁾。また、細胞を Triton X-100 のような非イオン性界面活性剤で処理すると、GPI アンカー型蛋白質やスフィンゴ糖脂質・コレステロールは不溶性画分に回収されることが知られていた。

1992 年 Brown らは、培養上皮細胞 MDCK (Madin-Darby canine kidney) を Triton 処理し、GPI アンカー型蛋白質が糖鎖付加後すなわちゴルジ体通過後に不溶性になることを示し、さらにこの不溶性の会合体をショ糖密度勾配遠心により分離する方法を確立した⁽³⁾。脂質分析の結果、ホスファチジルコリンなどのグリセロリン脂質は細胞内含有量の 9 割以上が不溶性画分から排除されたのに対し、スフィンゴ糖脂質はその半分以上が、スフィンゴミエリンについてはなんと 96% が不溶性画分に回収された。さらに電子顕微鏡観察により、この不溶性画分は直径 50~100 nm の膜構造であることも示された。これらの結果により先の Simons らの仮説は広く受け入れられるようになり、以後多くの研究者が Brown らの確立した分離方法を用いて、この特異的膜領域の生化学的解析を行なった。Simons らはこの特異的膜領域を「細胞膜という海に浮かんだプラットフォームのような構造」として、「ラフト (raft=筏)」と命名した⁽⁴⁾。

2. ラフトの構造

膜を構成している脂質は、リン脂質、スフィンゴ脂質、ステロールの 3 種類に大別される。リン脂質は分子中に

リン酸基を含む脂質で、そのほとんどがグリセロール骨格を有している。膜脂質の大半はリン脂質である。スフィンゴ脂質はスフィンゴシン骨格をもち、これにホスホリルコリンが付加したものがスフィンゴミエリン、糖鎖が付加したものがスフィンゴ糖脂質である。したがって、スフィンゴミエリンはリン脂質でもありスフィンゴ脂質でもあると言える。哺乳動物の場合、細胞に含まれるステロール類はほとんどコレステロールである。

コレステロールが、グリセロール骨格をもつリン脂質よりもスフィンゴシン骨格をもつスフィンゴ脂質と親和性が強く、リン脂質膜中でもコレステロール-スフィンゴ脂質複合体を作りやすいことは、人工膜を用いた研究により古くから知られていた。また、脂質二重膜は温度変化に伴い液晶相とゲル相の間で相転移を起こす。液晶相では脂質のパッキングが緩く側方拡散が比較的自由であるが、ゲル相では脂質はより秩序立った配向をとりパッキングは固い。この相転移が起こる温度は脂肪酸の飽和度が高いほど、そして脂肪酸鎖が長いほど高くなる。一般に、グリセロリン脂質は不飽和脂肪酸を含んでいるため固くパックすることができず、相転移温度は 0°C 以下と低い。一方、スフィンゴ脂質は飽和脂肪酸をもつことが多いため相転移温度は高く、スフィンゴミエリンで 40°C 前後、糖脂質では 70°C にまで及ぶものもある⁽⁵⁾。スフィンゴ脂質が Triton 不溶性になるには、この相転移温度が関係していると考えられる⁽⁶⁾。グリセロリン脂質でも脂肪酸が長く飽和度の高いものは相転移温度が高く、Triton 不溶性になる。このことから、スフィンゴ

脂質の Triton 不溶性が相転移温度に依存しているという考えが支持される。

では、細胞中ではこれらの脂質はどのように存在しているのだろうか。人工膜を生理的温度下におくと、液晶相のリン脂質中にスフィンゴ脂質がゲル相を作り、相分離を起こす。しかし、生体膜ではこのような相分離は観察されない。この謎を解く鍵はコレステロールにある。生体膜中の特異的膜領域「ラフト」にはコレステロールが豊富に存在する。前述の通りスフィンゴ脂質の膜は固くパッキングされているが、コレステロールが共存すると液晶相とゲル相の中間の性質をもつ liquid-ordered 相をとる。この場合も Triton 不溶性になる。これらのことから現在、ラフトの構造はスフィンゴ脂質がスフィンゴシン骨格どうしあるいは糖鎖どうしで、ファンデルワールス力・水素結合により会合し、脂質間にはコレステロールが水素結合することにより埋めている、というモデルが提示されている(図3)⁽⁷⁾。

ところで、形質膜ではスフィンゴ脂質は脂質二重層の外層に局在している。ラフトの内層の脂質についての情報は、現在のところまったくない。先にも述べた通り、ラフトにはスフィンゴミエリン、コレステロール、糖脂質といった脂質と、GPI アンカー型蛋白質などの蛋白質が含まれる。では、ラフトの形成に必要なものは何なのだろうか？ GPI アンカー型蛋白質をスフィンゴ脂質、コレステロール、リン脂質からなる人工膜に埋め込むと Triton 不溶性になる。逆に細胞においてスフィンゴ脂質とコレステロールの量を減少させると、GPI アンカー型蛋白質は Triton 可溶性になることが報告されている⁽⁸⁾。このことから、ラフトの形成に必要なのは膜蛋白質ではなく、膜脂質であることがわかる。さらに糖脂質の合成酵素を欠損したメラノーマ細胞でもラフトは正常に形成されることから、ラフトの形成に必須の成分

図3 ■ ラフトの構造

スフィンゴミエリンや糖脂質が多く集まっていて、これらの分子の間をコレステロールが埋めている。また GPI アンカー型蛋白質やいくつかの膜貫通蛋白質もこの領域に局在する。Src キナーゼなどの裏打ち蛋白質は、脂肪酸修飾を受けて膜にアンカーリングしている。

はコレステロールとスフィンゴミエリンであると考えられる⁽⁹⁾。

3. ラフトとカベオラ

細胞表面には数多くの窪み(ピット)が存在する。透過型電子顕微鏡で観察すると、ピットの裏打ち部分にクラスリンと呼ばれる蛋白質が集合して電子密度が高いため、黒ずんで見えるクラスリン被覆ピットと、そのような裏打ちの見られない非被覆ピットが観察される。カベオラは非被覆ピットの1つで、径50~80 nmの丸フラスコ型をしており、カベオリンと呼ばれるマーカー蛋白質をもつ⁽¹⁰⁾。細胞を Triton 処理すると、カベオリンは不溶性画分に回収される。またカベオリンにはコレステロール結合能があり、形質膜上のコレステロール量を減少させると窪み構造が失われる。さらにスフィンゴ脂質合成活性の低下した変異株細胞でも、カベオラは正常に形成されない。これらの性質は前に述べたラフトの性質によく似ており、カベオラがラフトそのものなのではないかという仮説が提出された。しかし、カベオリンを発現していない血球系の細胞などでも、コレステロールやスフィンゴ脂質に富む Triton 不溶性画分が存在するし、また Triton 不溶性画分に濃縮されるがカベオラには局在しない分子も存在する。したがって、カベオラ=ラフトという仮説は疑わしくなった。1995年 Schnitzer らは、内皮細胞の表面をコロイド状シリカで覆うと窪みの部分だけがコートされないことを利用して、カベオリンを含むカベオラと GPI アンカー型蛋白質を含むラフトとを分離することに成功した⁽¹¹⁾。現在では、カベオラはラフトの一種、あるいはラフトとは別物であるという考え方が主流になっている。

ラフトの定義は難しい。これまでに報告されたラフトの解析結果の多く(特に生化学的解析)は、実質は細胞を Triton 処理した不溶性画分の解析結果である。そのため、この不溶性画分には、DIG (detergent-insoluble glycolipid-enriched domain)、DRM (detergent resistant membrane)、TIFF (Triton-insoluble floating fraction)、GEM (glycolipid-enriched membrane) など様々な呼称がある。ラフトについての論文を読んだり考察したりする際に気をつけなければならないのは、これらが必ずしも Simons らの提唱したラフトと同義とは限らないという点である。これらの呼称が意味するのはあくまでも「細胞を低温で非イオン性界面活性剤処理し、不溶性の成分を密度勾配遠心法で分画した軽い浮遊性成分」であり、いわば実験産物である。一方、ラフトは実際の細胞上に存在すると想定される特異的膜領域

であり、ラフトの実体が完全に明らかになっていない現段階では、むしろ概念として捉えるほうが適切かもしれない。

4. ラフトの実体

生細胞において、ラフトの実体はどのようなものなのだろうか？ そもそもラフトは本当に存在するのだろうか？ ラフトに含まれる分子が次々と報告され、その細胞内局在が調べられた。しかし、これらの分子を免疫蛍光染色で観察するためには、大量発現させたり抗体などでクロスリンクしたりという操作が必要であった。このため、DIG は界面活性剤に溶けにくい分子の集まり、すなわち実験操作上のアーティファクトであって、ラフトを本当に反映したものではないのではないかという疑問が常につきまとっていた。最近になって、ラフトの実体解明に生物物理学的手法が取り入れられ、成果を上げている^(12,13)。蛍光共鳴エネルギー移動法、1分子追跡法、光ピンセット法などの方法は、数 nm 程度という分解能をもち、光学顕微鏡の分解能(～300 nm)よりもはるかに優れている。これらの方法を用いた研究の結果、実際の細胞にラフトが存在することが示され、その大きさが径 25～70 nm 程度であることが明らかとなった。

従来の方法でなかなかラフトの実体が捉えられなかった一因は、光学顕微鏡の分解能よりも小さいラフトのサイズにあり、クロスリンク後に観察されていたのは複数のラフトが集まってできた大ラフトだったと考えられる。また、ラフトの種類もいろいろあるらしい。生化学的手法によりとられた DIG には多くの種類の蛋白質が検出されるが、これらがすべて同一のラフト内に存在するわけではない。村瀬らの計算によると、ラフトの直径を 50 nm と仮定した場合に、1 個のラフト中に含まれる蛋白質の分子数は 25 となる。これでは DIG 中のすべての蛋白質を 1 個のラフトに保持することはできないので、構成分子の異なる複数の種類のラフトが存在すると考えられる。また、1 個のラフト中に数種類の蛋白質が局在するとすれば、1 種類の蛋白質はほんの数個しか存在しない。この計算からも、これまで通常の免疫蛍光染色法ではラフトが観察できなかったこともうなずける⁽¹⁴⁾。さらに上述の方法を用いて、ラフト内の分子の動きの観察も試みられている。

5. ラフトに局在する分子

DIG 中には多くの細胞内情報伝達分子が存在することが報告されている⁽⁴⁾。GPI アンカー型蛋白質や膜レセプター (EGF レセプター、PDGF レセプターなど)、三

量体 G 蛋白質、Src ファミリーチロシンキナーゼなどのリン酸化酵素、脂質 (スフィンゴミエリン、セラミド、イノシトールリン脂質) などである。このうち細胞内にある蛋白質は、パルミトイル化やミリスチル化などの飽和アシル鎖修飾を受けて、形質膜内層にアンカリングしている。このほかにも、細胞骨格蛋白質やチャネル蛋白質など多くの分子の存在が報告されている。しかし、DIG 中に含まれると報告された分子の中には、免疫蛍光染色の結果と一致しないものもある。また、どの分子がカベオラあるいはラフトに固有のものなのかも明らかではない。さらに前述の通り、報告されている分子すべてが同一のラフト中にランダムに存在するわけではなく、多様な種類のラフトが存在するものと考えられる。今後、個々の分子がどのようなラフトに局在しているのか、逆に 1 個のラフト中にどのような分子が共存しているのかを解析していくことで、さらにラフトの実体が明らかになるであろう。

では、ラフトに情報伝達分子が集合していることによどのような生理的意義があるのだろうか。まず、情報伝達に必要な分子を局在化することでその効率を上げていると考えられる。一方で、異なる伝達経路に関わる分子を別々のラフトに配置することで、不要なクロストークを防いでいる。さらに最近、ラフトは決して静的なものではなく、膜蛋白質や膜脂質がラフト中を動き回ったり、ラフト内外を行ったり来たりする動的な構造体であることがわかってきている。また外界からの刺激に応じてラフトそのものが動き、大きなラフトを形成する。この現象は、休止状態にある T 細胞が、抗原提示されると活性化され増殖を開始するという劇的な変化を遂げるのにきわめて有効である^(15,16)。

このようなラフトのダイナミクスは、情報伝達において信号強度や流れを変えたり、クロストークの仕方を変えたりするのに好都合であると思われる。ただし、細胞表面で受け取ったシグナルが内層の分子にどのようにして伝達されるのかは不明である。内外層の脂質のアシル基やコレステロールによる相互作用、未知の膜貫通蛋白質の介在などの可能性が考えられるがまだ報告はない。ラフトにおける情報伝達の分子機構の解明は今後の課題である。

スフィンゴミエリン特異的プローブを用いたアプローチ

ラフトの構造と機能は、蛋白質だけでなく膜脂質によっても支えられている。特にスフィンゴミエリンとコレステロールが、ラフトの形成に必須の成分であることは

すでに述べた。しかし、各脂質成分が細胞内でどのような動態を示し、ラフトの形成にどう関与しているかという分子機構は未だ不明である。これは、抗体などにより細胞内局在や分子間相互作用を解析できる蛋白質とは異なり、脂質は特異的な解析法に乏しいためである。第一に、脂質に対する抗体の作製は技術的に難しく、できたとしても細胞染色などの解析に適した特異性や親和性を備えているものは少ない。第二に、脂質は水に難溶で、水溶液中では常に集合体(膜)として挙動するため、特定の成分について解析するのも困難である。第三に、遺伝子から直接翻訳される蛋白質とは異なり、脂質の合成・代謝経路は多くの酵素反応を経るため、遺伝学的に解析することも容易ではない。したがって、細胞内で膜脂質がどのように動き、どこでどのような細胞機能に関与しているかを分子レベルで解明するためには、特定の脂質成分を特異的に検出できるような解析法を確立することが必要である。筆者らは、ラフトの形成に必須の脂質スフィンゴミエリンを特異的に検出できるプローブ(ライセニン)を確立し、それを用いた解析を進めている。

1. ライセニンのスフィンゴミエリン特異的結合

シマミミズ (*Eisenia foetida*) の体腔液は、溶血、血球凝集、抗菌、細胞毒性などの生理活性を示すことが以前から知られていた。1997 年関沢らは、シマミミズ体腔液から、ラット血管平滑筋収縮活性をもつ分子ライセニン (lysenin) を精製・クローニングすることに成功した^(17,18)。ライセニンはアミノ酸 297 残基からなる新規蛋白質で、その分子量はゲル濾過カラムおよびマスマス

トルでは約 33,000、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では約 41,000 であった。既知の蛋白質との相同性は見いだせなかったが、クローニングの過程でアイソフォームと思われる分子が 2 種類見つかった。ライセニンは平滑筋収縮作用のほかに、溶血作用、心筋の陽性変力・変時作用などをもつが、その標的分子は不明であった。筆者らは、ライセニンの作用が様々な細胞に及ぶことや、細胞の膜蛋白質画分への有意な結合が検出されないことなどから、ライセニンの標的分子が膜脂質ではないかと考え、その同定を行なった⁽¹⁹⁾。

モルモット心室乳頭筋およびヒツジ赤血球から調製した脂質画分に、ライセニンは強く結合した。一方、各種動物の赤血球に対するライセニンの溶血活性を検討したところ、ヒツジ赤血球はヒト・ラットよりも約 20 倍低いライセニン濃度で溶血が起こった。哺乳動物の赤血球の膜脂質組成には種差があり、ヒツジでは他の動物に比べてスフィンゴミエリン含量が高いことが知られている。赤血球におけるライセニン感受性の種差とスフィンゴミエリン含量の種差が一致することは、ライセニンの標的分子がスフィンゴミエリンである可能性を強く示唆していた。そこで次に、各種リン脂質、スフィンゴ脂質の精製標品を用いて、ライセニンとの結合性を ELISA 法、TLC イムノプロットング法により検討したところ、ライセニンはスフィンゴミエリンにのみ結合した(図 4)。ジパルミトイルホスファチジルコリンは分子内にホスホリルコリン残基を有し、脂肪酸鎖が 2 本とも飽和アシル鎖であるために相転移温度が高いという点で、スフィンゴミエリンによく似た構造・性質をもっている。しかし、

図 4 ■ ライセニンのスフィンゴミエリン特異的結合

A: ELISA 法によりリン脂質との結合性を検討した。B: TLC イムノプロットング法によりスフィンゴ脂質との結合性を検討した。

ライセニンとはジパルミトイルホスファチジルコリンにも結合しないことから、その結合がスフィンゴミエリンにきわめて特異的であることが明らかとなった。ライセニンによる認識には、スフィンゴシン骨格・脂肪酸・リン酸基・コリン残基からなるスフィンゴミエリンの全体構造が必要であり、おそらくライセニンは膜にもぐり込んでスフィンゴミエリンに結合しているものと予想される。さらに各種脂質の人工膜を作製しライセニンの作用を検討したところ、スフィンゴミエリンを含む膜のみがライセニンにより崩壊した。したがって、ライセニンは膜中のスフィンゴミエリンに特異的に結合することにより膜崩壊をひき起こしていると考えられる。

「ラフトの構造」の項でも述べた通り、スフィンゴミエリンは膜中でコレステロールと相互作用しやすいことが知られている。そこで、ライセニンとスフィンゴミエリンの結合においてコレステロールがどう影響するかを、溶血阻害実験、および表面プラズモン共鳴を応用したBIAcoreシステムにより解析した。その結果、ライセニンとスフィンゴミエリンの結合におけるアフィニティーはきわめて強いこと($K_D=5.3$ nM)、コレステロールの共存によりアフィニティーはほとんど変化しないが、ライセニンの膜への結合量が増大することが明らかとなった。スフィンゴミエリン分子間にコレステロールが入り込むことにより、密だったパッキングが緩められてスフィンゴミエリンの全体構造が認識されやすくなったためではないかと考えている。

ライセニンのほかに、いくつかのグループがシマミズ体腔液中の生理活性物質の単離に成功している。1997年に報告されたfetidineは、ライセニンのアイソフォームの1つとアミノ酸配列が一致していたが、その脂質結合性については検討されていない⁽²⁰⁾。やはり1997年に報告されたeiseniaporeは、スフィンゴミエリンのほかに糖脂質の1種ガラクトシルセラミドにも結合する⁽²¹⁾。また、広田らは抗スフィンゴミエリンモノクローナル抗体を樹立したが、これはスフィンゴミエリンだけでなく、飽和脂肪酸をもったホスファチジルコリンにも結合する⁽²²⁾。ライセニンはこれまで報告された中で唯一のスフィンゴミエリン特異的結合蛋白質であり、今後スフィンゴミエリンの細胞内動態や他の分子との相互作用を解析していく上で、きわめて有用なプローブになると考えられる。

2. ライセニンを用いて何を解析するか

まず、ライセニンを用いた細胞染色により、スフィンゴミエリンの細胞内分布の観察が初めて可能になった。

これまではスフィンゴミエリンを特異的に検出できるようなプローブがなかったために、その分布を可視化することはできなかった。代わりに、蛍光標識したスフィンゴミエリンを細胞に取り込ませてその分布を観察する方法が取られていたが、蛍光スフィンゴミエリンは水溶性が高く生体内にあるスフィンゴミエリンとは物性が異なるため、細胞本来のスフィンゴミエリン分布を反映しているかどうか疑わしい。その点ライセニンは、細胞が本来もっているスフィンゴミエリンを検出することができ、電子顕微鏡観察や生物物理学的手法を取り入れれば、より細かなスフィンゴミエリン分布の解析が期待できる。今後、細胞の分化・細胞周期の変化・受精反応など、どのような局面でスフィンゴミエリン分布がどう変化するのかを観察したいと考えている。

また、ライセニンの細胞毒性を利用して、ライセニン耐性の変異株を樹立・解析することができる。スフィンゴミエリンは、その大半が細胞形質膜の外層に局在していると言われている。したがって、ライセニン耐性株では細胞表面のスフィンゴミエリン含量が低下しているか、あるいはスフィンゴミエリンがライセニンに認識されにくいような存在状態にあることが予想される。そのような変異株でスフィンゴミエリンの細胞内動態を解析し、さらにどのような細胞機能の変化が起きているかを解析することで、スフィンゴミエリンの生理機能が明らかにできると考えられる。現在筆者らの研究室では、いくつかの細胞種で耐性株を樹立・解析中であり、未だ明らかになっていないスフィンゴミエリンの細胞内輸送経路やラフトとの関連などを解明する糸口になるものと考えている。また花田らも、CHO細胞(チャイニーズハムスター卵巣由来繊維芽細胞)についてライセニン耐性変異株を樹立し、スフィンゴミエリンの合成経路や輸送経路の解析を進めている⁽²³⁾。

またライセニンの無毒化も重要な課題である。ライセニンには膜傷害活性があるため生細胞を用いた実験はできない。ライセニンをもとに毒性のない新たなスフィンゴミエリン特異的プローブを開発するために、現在いくつかの検討を行なっている。一つはライセニンによる膜崩壊機構の解明である。これまでの解析から、ライセニンはスフィンゴミエリン膜中で温度依存的に不可逆的な会合体を形成し、このことが膜崩壊につながっていることがわかっている。ライセニン自体は可溶性蛋白質であるが、膜と相互作用するとその立体構造が変化して膜に埋め込まれた会合体となる。そこでライセニン分子上のスフィンゴミエリン結合領域あるいは会合に必要な領域の同定を行ない、膜中で会合しないライセニンの作製を

試みている。2つめは点変異導入によるライセニン変異体の作製である。膜との作用に重要であると予想されるいくつかのアミノ酸を置換した変異体を作製し、その活性を検討中である。

さらにこれまでの解析から、ライセニンがスフィンゴミエリンの存在状態を見分けている可能性が考えられる。たとえば、神経細胞にはスフィンゴミエリンが存在するにもかかわらず、ライセニンで細胞染色されない。またこれまでに樹立したライセニン耐性変異株の中にも、細胞表面のスフィンゴミエリン含量は正常なのにライセニン耐性を示す株がある。これらの細胞ではスフィンゴミエリンの存在状態が他とは異なっているために、ライセニンにその全体構造が認識されにくくなっていると思われる。今後はライセニンがどのような存在状態のスフィンゴミエリンを認識しているかを明らかにし、細胞によって膜環境が異なることを実証したいと考えている。

文献

- 1) K. Simons & G. van Meer : *Biochemistry*, **27**, 6197 (1988).
- 2) T.E. Thompson : *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, **14**, 361 (1985).
- 3) D.A. Brown & J.K. Rose : *Cell*, **68**, 533 (1992).
- 4) K. Simons & E. Ikonen : *Nature*, **387**, 569 (1997).
- 5) 佐藤清隆, 小林雅通 : “脂質の構造とダイナミクス”, 共立出版, 1992.
- 6) D.A. Brown & E. London : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 1 (1997).

- 7) T. Harder & K. Simons : *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 534 (1997).
- 8) M. Muniz & H. Riezman : *EMBO J.*, **19**, 10 (2000).
- 9) A.G. Ostermeyer, B.T. Beckrich, K.A. Ivarson, K.E. Grove & D.A. Brown : *J. Biol. Chem.*, **274**, 34459 (1999).
- 10) R.G.W. Anderson : *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 199 (1998).
- 11) J.E. Schnitzer, D.P. McIntosh, A.M. Dvorak, J. Liu & P. Oh : *Science*, **269**, 1435 (1995).
- 12) R. Varma & S. Mayor : *Nature*, **394**, 798 (1998).
- 13) A. Pralle, P. Keller, E.L. Florin, K. Simons & J.K. Horber : *J. Cell Biol.*, **148**, 997 (2000).
- 14) 村瀬琴乃, 楠見明弘 : 細胞工学, **18**, 1495 (1999).
- 15) A. Viola, S. Schroeder, Y. Sakakibara & A. Lanzavecchia : *Science*, **283**, 680 (1999).
- 16) P.W. Janes, S.C. Ley & A.I. Magee : *J. Cell Biol.*, **147**, 447 (1999).
- 17) Y. Sekizawa, K. Hagiwara, T. Nakajima & H. Kobayashi : *Biomed. Res.*, **17**, 197 (1996).
- 18) Y. Sekizawa, T. Kubo, H. Kobayashi, T. Nakajima & S. Natori : *Gene*, **191**, 97 (1997).
- 19) A. Yamaji, Y. Sekizawa, K. Emoto, H. Sakuraba, K. Inoue, H. Kobayashi & M. Umeda : *J. Biol. Chem.*, **273**, 5300 (1998).
- 20) A. Milochau, M. Lassegues & P. Valembois : *Biochim. Biophys. Acta*, **1337**, 123 (1997).
- 21) S. Lange, F. Nussler, E. Kauschke, G. Lutsch, E.L. Cooper & A. Herrmann : *J. Biol. Chem.*, **272**, 20884 (1997).
- 22) K. Hirota, K. Momoeda, K. Ono, K. Hanaoka, K. Horioka, K. Okumura & M. Iwamori : *J. Biochem.*, **118**, 4 (1995).
- 23) K. Hanada, T. Hara, M. Fukasawa, A. Yamaji, M. Umeda & M. Nishijima : *J. Biol. Chem.*, **273**, 33787 (1998).

お知らせ

第28回核酸化学シンポジウム

共催：日本薬学会他

日時：平成13年11月7日(水)～11月9日(金)

会場：横浜市中区本町1-6 横浜市開港記念会館

講演申込締切：5月25日(金)

講演要旨(英文)締切：7月6日(金)

参加登録予約申込締切：9月14日(金)

討論主題：核酸および関連化合物の④有機化学(モノマー),

- ⑧有機化学(オリゴマー), ⑨物理化学および分析化学, ⑩生化学および分子生物学, ⑪リボザイム・アンチセンス, ⑫その他

発表形式：口頭発表は1演題あたり発表15分, 質疑応答5分。この他にポスターセッション(全発表の1/2程度)を設けます。

発表申込方法：申込はE-mailをお願いします。なお原則として, 1研究室あたり口頭およびポスターを含め2件以内に限定させていただきます。①希望主題, ②発表形式(口頭またはポスター), ③演題(英語および日本語), ④発表者の所属・氏名(講演者に○, 英語および日本語), ⑤連絡先

(住所, Tel, Fax, E-mail), ⑥和文要旨(約200字)の順に記入し, nacs@bio.titech.ac.jp まで送付下さい。

E-mail がご使用になれない場合は, A4判の用紙に上記の事項を記入の上, 原稿をテキスト形式で保存したフロッピーディスクと, 返信宛先および演題名を記入した返信用葉書を添えて, 下記宛にお申し込み下さい。発表希望の分野その他の詳細は, ホームページをご覧ください。

参加登録費：予約一般8,000円, 予約学生5,000円(当日各2,000円増し)

懇親会：11月8日(木) 夕方開催予定。会費8,000円

申込・連絡先：〒226-8501 横浜市緑区長津田町4259

東京工業大学大学院生命理工学研究科分子生命科学専攻 関根光雄, または清尾康志(せいこうじ)

Tel : 045-924-5706, Fax : 045-924-5772

E-mail : nacs@bio.titech.ac.jp

ホームページ : <http://xtal.bio.titech.ac.jp/NACS28/>

オーガナイザー：関根光雄(東工大生命理工), コーオーガナイザー：西村善文(横浜市大総合理学)